

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590381
研究課題名（和文） 容量負荷拡張性心肥大における心筋細胞リモデリングの解析
研究課題名（英文） Analysis of myocardial sarcomere-formation and sarcomere-removal of volume-overloaded and overload-removed hearts
研究代表者
増田 弘毅 fi@4FH74; <EBG4>8f1
秋田大学・医学部・教授
研究者番号：60103462

研究成果の概要：容量負荷あるいは負荷減免により心筋細胞の筋節が増減する。頸動脈と頸静脈内吻合による容量負荷により家兎心は心筋介在板が2日周期で狭幅-狭を繰り返し拡張した、拡張した心は内吻合閉鎖による負荷減免により2日周期で狭幅-狭を繰り返し収縮した。この周期は連続する2回の補完的な指入れ構造の延長と短縮からなり、1回毎に一つの筋節が出現（負荷時）あるいは消失（減免時）していた。介在板は筋節の編み出し機構である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：容量負荷、動静脈吻合、心筋細胞、介在板、interdigitation、筋節

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトあるいは哺乳類の心はその体格あるいは活動性に相当する大きさがある。成長過程でヒト心は生後数十グラムから300グラムまで大きくなる。自動車等のエンジンは排気量に変化しないが、心は排気量が負荷にあわせて増大する。通常心筋細胞は出生後すみやかに分裂増殖を停止し、出生後の生理学的な成長において、心筋細胞の総数は一定と考えられている。そのため拡張性心肥大において個々の心筋細胞が長くなる。しかし心筋細胞がどのようにして長くなるのかいまだ明らかではない。

心筋細胞は両端が介在板（Intercalated

disc）で隣接する心筋細胞と繋がっている。介在板の両側面にはいわゆる移行帯（Transitional junction）があり、これは通常の筋節（Sarcomere）のZ板（Z-line）と相同である。したがって心筋細胞は整数倍の筋節（Sarcomere）の長さを持っていることになる。つまり心筋細胞が長くなることは心筋細胞に新しい筋節（Sarcomere）が加わることである。

筋節（Sarcomere）は分子学的に一つの決まった収縮の基本単位で、アクチンとミオシンからなり、約2ミクロンの巾がある。今まで1/2の筋節（Sarcomere）や1/3の筋節（Sarcomere）を確認した報告はなく、筋節

(Sarcomere) は完成した一つの単位として出現するように見える。今まで筋節 (Sarcomere) が新しく出現した様子を記載した論文はない。一方容量負荷による拡張性心肥大は負荷を減免すると収縮し、肥大が消失する。この場合新しく加わった筋節 (Sarcomere) が消失することになるが、筋節 (Sarcomere) の消失の過程を記載した論文はなく、そのメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は1) 容量負荷心において新しい筋節 (Sarcomere) 加わり方を形態学的に検討すること、2) 拡張した容量負荷心において負荷減免により筋節 (Sarcomere) の消失を形態学的に検討すること、3) 容量負荷と負荷減免を繰り返し拡張と収縮の繰り返しが存在することを検討する事である。

## 3. 研究の方法

[動物] 500羽の雄成日本家兎 (3-5kg) を使用した。

[手術] 1) 容量負荷実験; 容量負荷は左総頸動脈と左外頸静脈に内吻合を作成することにより行った。負荷後 0-6-hour, 12-hour, 18-hour, 24-hour (1-day), 30-hour (1.25-day), 36-hour (1.5-day), 42-hour (1.75-day), 48-hour (2-day), 2.5-day, 3-day, 3.5-day, 4-day, 5-day, 6-day, 7-day, 8-day, 13-day, 14-day, 15-day, 27-day, 28-day, 29-day, 55-day, 56-day, 57-day, 16-week, over 20-week 飼育した。2) 容量負荷減免実験; 容量負荷減免は内吻合を閉鎖することにより行った。A: 2-day 容量負荷において閉鎖後 12-hour, 1-day, 1.5-day, 2-day 飼育した。B: 3-day 容量負荷において閉鎖後 12-hour, 1-day, 1.5-day, 2-day, 2.5-da, 3-day 飼育した。C: 4-day 容量負荷において閉鎖後 1-day, 2-day, 3-day, 4-day 飼育した。D: 4-week 容量負荷において閉鎖後 1-day, 2-day, 3-day, 4-day, 1-week, 2-week, 3-week, 4-week 飼育した。3) 繰り返し容量負荷-容量負荷減免実験; 4-week 容量負荷と 6-week 容量負荷減免を3回繰り返すことにより行った。

[測定] 1) 心エコーを用いて、心肥大の経過を観察した。左心室 End-diastolic diameter とドップラーによる拍出量の計測を行った。2) 電磁流量計とパルスドップラー血流計による左総頸動脈血流量の測定を行った。

[光顕観察] 組織は還流固定を行い、左心室の横断標本を作製した。固定は glutar aldehyde 液と paraformaldehyde 液で固定した。通常の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色と Azan-Mallory (AM) 染色をすべてに行った。また Paraformaldehyde 固定あるいは短時間 Glutaraldehyde 固定後

Paraformaldehyde 固定を用いて N-Cadherin による介在板の免疫染色を作成した。

[電顕] Glutaraldehyde 固定し、左心室壁を観察した。

## 4. 研究成果

1) 容量負荷により拡張性心肥大が生じ、負荷減免により心はふたたび縮小した。またこの変化は3回の繰り返しが可能であった。

2) 心肥大は心筋細胞の伸長を示し、縮小は短縮をしめしていた。組織学的に一個の心筋細胞の最も遠い介在板から介在板までの筋節の数を計測したが、容量負荷心では、対象でほぼ 60 筋節であった。1-week で 66-67 筋節、2-week で 73-75 筋節、4-week で 84-88 筋節とほぼ一日に一筋節の割合で長くなっていた。一方 4-week 容量負荷心は負荷減免により一日に一筋節の割合で短くなっていた。また繰り返し負荷と負荷減免を繰り返した心では 4-week 毎に 84-88 筋節になり、6-week 減免ごとに 60 筋節に戻っていた。

3) 様々な容量負荷あるいは負荷減免において、個々の心臓における介在板の形態はほぼすべての心筋細胞において同じである。

4) 容量負荷後介在板は2日の周期で変化する。負荷前は巾が狭く、負荷後1日で巾が広く筋節二つ分になり、負荷後2日で再び巾が狭くなる。

5) 6時間毎に観察すると、周期の中ではほぼ5つのモードが確認できた。0日から2日までの変化をまとめると次のようになる。

I-mode (control): 介在板の巾は 1/4 ないし 1/3 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ないし 1/3 筋節の長さである。II-mode (6-hour): 介在板の巾は 1 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1 筋節の長さである。

III-mode (12-hour): 介在板に約 1-筋節の深さがあり、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) の巾のある溝が裏表に生じ、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ないし 1/3 筋節の長さである。したがって介在板は一つの筋節を挟むように折れ曲がり、光顕では巾の狭い二列にみえる。IV-mode (1-day): 介在板に約 1-筋節の深さがあり、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) の巾のある溝が裏表に生じ、指入れ構造 (Interdigitation) は 1 筋節の長さである。介在板は二つの筋節全体に広がったように見える。この mode が周期の中で幅広くなった時である。V-mode (1.5-day): 介在板の溝は無くなる。多くの指入れ構造 (Interdigitation) は 1/3-1/4 筋節の長さで巾が狭いが、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) 毎に棘のように両側に飛び出す長い一個の指入れ構造 (Interdigitation) が認められる。I-mode (2-day): 介在板の巾は 1/4 ないし 1/3 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ない

し 1/3 筋節の長さである。この時点で Control に戻り、一つの周期が完成したことになる。

6) 二回目の周期 (2 日から 4 日) はほぼ同様な mode で形成されていた。

7) 三回目と四回目の周期は一日毎に観察したが、5 日-IV-mode、6 日-I-mode、7 日-IV-mode、8 日-I-mode で周期が存在していた。

8) 8 日までの観察で奇数日が IV-mode で偶数日が I-mode であることが明らかになった。そこで 2-week, 4-week, 8-week において、それぞれプラスマイナス 1 日の実験を行って確認した。その結果 8-week においても周期が持続している事が明らかになった。しかし 16-week 以降では奇数日にもかかわらず I-mode になっており、周期が終了したことを推測させた。

9) 負荷減免において、介在板は 2 日の周期で変化する。偶数日負荷の場合、最初は巾が狭く、負荷後 1 日で巾が広く筋節二つ分になり、負荷後 2 日で再び巾が狭くなる。これが繰り返して現れた。奇数日負荷の場合、最初は巾が広く筋節二つ分であったが、負荷後 1 日で巾が狭くなり、負荷後 2 日で再び広がった。これが繰り返して現れた。

10) 負荷後 2 日の心を負荷減免し、6 時間毎に観察すると、周期の中で容量負荷と同様なほぼ 5 つのモードが確認できた。減免なので同じ形態であるが、reversal として(r)をつける。I-mode (2-day): 介在板の巾は 1/4 ないし 1/3 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ないし 1/3 筋節の長さである。Vr-mode (1.5-day): 多くの指入れ構造 (Interdigitation) は 1/3-1/4 筋節の長さで巾が狭いが、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) 毎に棘のように両側に飛び出す長い一つの指入れ構造 (Interdigitation) が認められる。IVr-mode (1-day): 介在板に約 1-筋節の深さがあり、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) の中のある溝が裏表に生じ、指入れ構造 (Interdigitation) は 1 筋節の長さである。介在板は二つの筋節全体に広がったように見える。この mode が周期の中で幅広くなった時である。IIIr-mode (1.5-day): 介在板に約 1-筋節の深さがあり、二から三つの指入れ構造 (Interdigitation) の中のある溝が裏表に生じ、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ないし 1/3 筋節の長さである。したがって介在板は一つの筋節を挟むように折れ曲がり、光顕では巾の狭い二列に見える。IIr-mode (1.75-day): 介在板の巾は 1 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1 筋節の長さである。Ir-mode (2-day): 介在板の巾は 1/4 ないし 1/3 筋節巾で、指入れ構造 (Interdigitation) は 1/4 ないし 1/3 筋節の長さである。この時点で Control に戻り、一つの周期が完成した

ことになる。

1 1) 電顕観察において容量負荷において II から III-mode および IV から V-mode で未熟な筋線維が観察された。

1 2) 電顕観察において容量負荷において V から IV-mode および III から II-mode で筋線維の消失様の場所が観察出来た。

1 3) 以上をもとに介在板における筋節の出現と消失のメカニズムの仮説を次のように考えた。

[容量負荷時] 指入れ構造 (Interdigitation) は 2 日周期の間に 2 回長くなったり、短くなったりする。長くなる時はすべて一様に長くなる。短くなる時、一回目 (mode-II to III) は、隣り合わせる 2-3 の指入れ構造 (Interdigitation) が短縮し、その隣の 2-3 の指入れ構造 (Interdigitation) は反対側に短縮し、巾が 2-3 の指入れ構造 (Interdigitation) を持つ溝が互いに入り組んだ状態になる。その段差の中に一回目の新しい筋節が生まれる。二回目の短縮 (mode-V to IV) は、数個ならんだ指入れ構造 (Interdigitation) の中央のものが、短くなり、溝構造を打ち消す。しかし外側の指入れ構造 (Interdigitation) はそのまま残り、中央の指入れ構造 (Interdigitation) がうまく短縮するための支持の働きをする。この短縮の空間に二回目の新しい筋節がうまれる。結果として新しい二つの筋節は互いに補完的になり、介在板はほぼ真つすぐになる。残っていた指入れ構造 (Interdigitation) は筋節の完成とともに短縮し、介在板は平で薄くなる (mode-V to I)。

[容量減免時] 偶数日負荷の心では薄く平坦な介在板から両側に多数の指入れ構造 (Interdigitation) が 1 筋節の長さに伸び、あたかも介在板から両側に 1 筋節長の棘が出ているようになる (mode-I to Vr)。この棘の間に 2-3 の連続した指入れ構造 (Interdigitation) が伸びてくる (mode-Vr to IVr)。この時伸長する指入れ構造 (Interdigitation) が打ち消すように一つの筋節が消失する。この場合両側に互い違いに伸びるため 1 筋節の深さで 2-3 の指入れ構造 (Interdigitation) の巾を持つ溝が出現する。伸長した指入れ構造 (Interdigitation) は短縮する (mode-IVr to IIIr)。次に指入れ構造 (Interdigitation) が伸びる (mode-IIIr to IIr)。この時伸長する指入れ構造 (Interdigitation) が打ち消すように一つの筋節が消失する。この時溝が消失する。次に伸長した指入れ構造 (Interdigitation) が短縮し (mode-IIr to Ir)、平坦な介在板が出現する。奇数日負荷の心では mode-IVr から出発し、mode-IIIr から mode-IIr を経て mode-Ir となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①Makoto Yoshida, Hirotake Masuda, et al. Weaving hypothesis of myocardial cell sarcomeres - Discovery of periodic broadening and narrowing of intercalated disc during volume-load change - Am J Pathol (投稿中)

[学会発表] (計 7 件)

- ①Hirotake Masuda, et al. Venous Narrowing After Long Time High Flow in Experimental Canine Carotid-Jugular Fistula. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2009. April 29 - May 18, 2009. Omni Shoreham Hotel, Washington, D. C., USA.
- ②川村公一, 増田弘毅, 他. 心筋細胞肥大過程の電顕的検討. 第40回日本臨床分子形態学会総会. 2008年10月3-4日. 福岡国際会議場, 福岡, 日本
- ③川村公一, 増田弘毅, 他. 心筋細胞肥大はどのようにして大きくなるか. 第3回ウサギフォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」. 2008年7月26日. 神戸大学医学部新緑会館, 神戸, 日本.
- ④吉田 誠, 増田弘毅, 他. 実験的容量負荷心肥大の研究. 第97回日本病理学会総会 2008年5月15-17日. 石川県立音楽堂 他, 金沢, 日本.
- ⑤Hiroshi Nanjo, Hirotake Masuda, et al. Localization and Distribution of Endothelial Cells of Bone Marrow Origin Associated with Hemodynamic Conditions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2008. April, 16-18, 2008. Omni Hotel at CNN Ceter, Georgia, USA.
- ⑥Mikio Kobayashi, Hirotake Masuda, et al. Dendritic Cells and Smooth Muscle Cells of Bone Marrow Origin at the Non-atherosclerotic Normal Aorta in Old Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2008. April, 16-18, 2008. Omni Hotel at CNN Ceter, Georgia, USA.
- ⑦Masayo Komatsu, Hirotake Masuda, et al. 3-day high-flow loaded rabbit carotid

artery remodels automatically ex vivo. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2007. April, 19-21, 2007. Palmer House Hilton-Chicago, IL, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 弘毅 [hif@f4f74](mailto:hif@f4f74); <EBC4>8fi  
秋田大学・医学部・教授  
研究者番号: 60103462

### (2) 研究分担者

川村 公一 [f5k5aif5?C=7<=](mailto:f5k5aif5?C=7<=)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00091801  
南條 博 [fiA4A=B](mailto:fiA4A=B); <EBF; <fi  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号: 70250892  
高橋 正人 (TAKAHASHI MASATO)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号: 10315806  
小林 実貴夫 (KOBAYASHI MIKIO)  
秋田大学・医学部・技術長  
研究者番号: 20375306

### (3) 連携研究者